



#3.  
RECEIVED  
7/11/01

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE MAY 23 2001

TECH CENTER 1600/2900

In re the Application of: **Nobutaka YAMAMOTO et al.**

Serial No.: **09/718,388**

Group Art Unit: **1636**

Filed: **November 24, 2001**

Examiner: Not yet assigned

For: **A METHOD FOR CULTURING CELL AND A CULTURE VESSEL**

**CLAIM FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119**

Commissioner for Patents  
Washington, D. C. 20231

Date: May 21, 2001

Sir:

The benefit of the filing dates of the following prior foreign applications are hereby requested for the above-identified application, and the priority provided in 35 U.S.C. 119 is hereby claimed:

**Japanese Application No. 11-336208 filed on November 26, 2001**

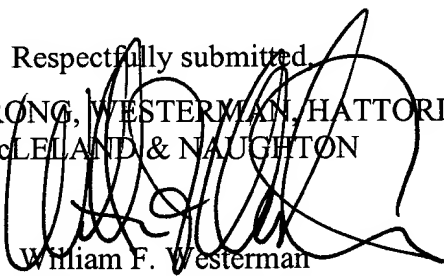
**Japanese Application No. 11-336210 filed on November 26, 2001**

In support of this claim, the requisite certified copies of said original foreign applications are filed herewith.

It is requested that the file of this application be marked to indicate that the applicants have complied with the requirements of 35 U.S.C. 119 and that the Patent and Trademark Office kindly acknowledge receipt of said documents.

In the event that any fees are due in connection with this paper, please charge our Deposit Account No. 01-2340.

Respectfully submitted,  
ARMSTRONG, WESTERMAN, HATTORI,  
McLELLAND & NAUGHTON

  
William F. Westerman  
Attorney for Applicants  
Reg. No. 29,988

Atty. Docket No. **001554**  
1725 K Street, N.W., Suite 1000  
Washington, DC 20006  
Tel: (202) 659-2930  
Fax: (202) 887-0357  
WFW/klh  
Enclosure(s): Two (2) Priority Documents



日本国特許庁  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1999年11月26日

出願番号

Application Number:

平成11年特許願第336208号

出願人

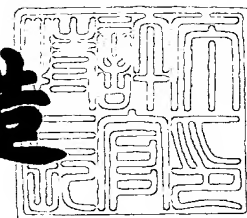
Applicant (s):

株式会社メニコン

2000年 8月18日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3065253

【書類名】 特許願

【整理番号】 JP-11712

【提出日】 平成11年11月26日

【あて先】 特許庁長官 近藤 隆彦 殿

【国際特許分類】 A61L 27/00  
C12N 1/00

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県春日井市高森台五丁目 1 番地 1 0 株式会社メニ  
コン 総合研究所内

【氏名】 山本 宣貴

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県春日井市高森台五丁目 1 番地 1 0 株式会社メニ  
コン 総合研究所内

【氏名】 杉山 章寿

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県春日井市高森台五丁目 1 番地 1 0 株式会社メニ  
コン 総合研究所内

【氏名】 河南 哲

【特許出願人】

【識別番号】 000138082

【氏名又は名称】 株式会社メニコン

【代理人】

【識別番号】 100065226

【弁理士】

【氏名又は名称】 朝日奈 宗太

【電話番号】 06-6943-8922

【選任した代理人】

【識別番号】 100098257

【弁理士】

【氏名又は名称】 佐木 啓二

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 001627

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9707841

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 細胞の接着および増殖方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 哺乳動物由来の線維芽細胞を播種、培養後、死滅させる工程を含む細胞の接着および増殖方法。

【請求項 2】 死滅させた線維芽細胞の少なくとも一部を剥離させることを特徴とする請求項 1 記載の細胞の接着および増殖方法。

【請求項 3】 死滅させた線維芽細胞を完全に剥離させることを特徴とする請求項 1 記載の細胞の接着および増殖方法。

【請求項 4】 凍結および／または乾燥処理により線維芽細胞を死滅させることを特徴とする請求項 1 記載の細胞の接着および増殖方法。

【請求項 5】 線維芽細胞が 3 T 3 マウス肺線維芽細胞であることを特徴とする請求項 1 記載の細胞の接着および増殖方法。

【請求項 6】 細胞が上皮系細胞であることを特徴とする請求項 1 記載の細胞の接着および増殖方法。

【請求項 7】 上皮系細胞が表皮角質化細胞であることを特徴とする請求項 6 記載の細胞の接着および増殖方法。

【請求項 8】 細胞が肝細胞であることを特徴とする請求項 1 記載の細胞の接着および増殖方法。

【請求項 9】 請求項 1 記載の細胞の接着および増殖方法により培養された表皮細胞によって作製された表皮細胞シート。

【請求項 10】 請求項 1 記載の細胞の接着および増殖方法により培養された表皮細胞を用いて、調製された表皮細胞懸濁液。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、細胞の接着および増殖方法に関する。詳しくは、上皮系細胞および肝細胞の接着および増殖方法に関する。さらに詳しくは、熱傷、創傷、褥瘡または皮膚潰瘍などの皮膚欠損創に用いて、欠損組織を早期に再建させるまたは治療

するための表皮細胞シートおよび表皮細胞懸濁液に用いる表皮細胞の培養法、肝機能解析に重要な肝細胞培養法および前記培養法により作製された表皮細胞シートおよび表皮細胞懸濁液に関する。

【0002】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】

従来、上皮細胞のうち、表皮角質化細胞（以下、表皮細胞という）培養法としては、ガンマ線などの放射線やマイトマイシンCなどの薬剤を用い、生存しながら分裂・増殖能を欠失させた、いわゆる不稔化した3T3マウス肺線維芽細胞などをフィーダーレイヤーとし、表皮細胞を培養する方法（ジェームズ ジー ラインモルドおよびハワード グリーン、セル（Cell）、第6巻、331～344頁、（James G. Rheinmald and Howard Green, Cell 6: 331-344. Serial Cultivation of Strains of Human Epidermal Keratinocytes: the Formation of Keratinizing Colonies from Single Cells.）などに記載されているフィーダーレイヤー法）と、フィーダーレイヤーとなる細胞を用いずMCDB153などの無血清培地を用い培養する方法が広く用いられてきた。

【0003】

しかし、たとえば3T3マウス肺線維芽細胞をフィーダーレイヤーとする従来のフィーダーレイヤー法では、表皮細胞播種直前に前記3T3マウス肺線維芽細胞を調製する必要がある煩雑で、フィーダーレイヤーが有効である期間も限定される。マウス以外の表皮細胞（たとえば、ヒト表皮細胞）の増殖および表皮細胞シートの作製においては、これらに3T3マウス肺線維芽細胞という異種の細胞が混入する恐れがあり、また3T3マウス肺線維芽細胞の分裂・増殖能を欠失させる際に用いられるマイトマイシンCなどの薬剤の残留も懸念される。

【0004】

一方、3T3マウス肺線維芽細胞の代わりに、得ようとする表皮細胞および／または表皮細胞シートと同種の線維芽細胞（たとえば、ヒト表皮細胞シートを作製する際には、ヒト線維芽細胞を用いる）をフィーダーレイヤーとして利用する際には、異種の細胞が混入することはないものの、やはり線維芽細胞の分裂・増殖能を欠失させる必要があるため、マイトマイシンCなどの薬剤の残留が懸念さ

れる。また、ヒト線維芽細胞などを用いると、3 T 3 マウス肺線維芽細胞を用いるより、表皮細胞の増殖が遅い。

【0 0 0 5】

また、無血清培地を用いる方法は、3 T 3 マウス肺線維芽細胞などフィーダーレイヤーとなる細胞を用いる方法に比べ、表皮細胞の増殖が遅く培養に日数がかかる場合が多く、また表皮細胞の分化を抑える作用が培地にあるため、表皮細胞が重層化せず表皮細胞シートが作製できない場合があった。

【0 0 0 6】

特開昭 6 2 - 2 8 5 7 8 1 には、肝細胞培養においてもフィーダーレイヤーを用いる方法が報告されているが、やはり薬物残留の可能性や異種の細胞が混入する可能性は否定できない。

【0 0 0 7】

本発明は、従来のフィーダーレイヤー法で必要であった線維芽細胞などフィーダーレイヤーとなる細胞の調製や該細胞の不稔化の工程を省くことができ、かつ異種細胞の混入がない表皮細胞シートおよび表皮細胞懸濁液を得ることができ、さらに該方法における場合に比べ、細胞の接着性および増殖性を向上させることができる、哺乳動物由来の線維芽細胞を播種、培養後、死滅させる工程を含む細胞の接着および増殖方法を提供することを目的とする。

【0 0 0 8】

具体的には、哺乳動物由来の線維芽細胞、とくに、3 T 3 マウス肺線維芽細胞を培養器内で培養したあと、該培養器中で凍結および／または乾燥などの処理により該細胞を死滅させ、少なくとも一部を剥離することによって、実質的に、該培養細胞が分泌して堆積した細胞外マトリックスなどの成分を培養器中の培養面に残すことにより、つまりは、細胞の接着に必要となる成分を該培養面に残すことにより、細胞の接着性および増殖性を付与する細胞の接着および増殖方法を提供することを目的とする。

【0 0 0 9】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、表皮細胞シートを形成するための表皮細胞および肝細胞の培養

条件について鋭意検討した結果、哺乳動物由来の線維芽細胞を播種、培養後、死滅させ、その少なくとも一部を剥離することによって、実質的に、該培養細胞が分泌して堆積した細胞外マトリックスなどの成分を培養器中の培養面に残すことにより、従来のフィーダーレイヤー法で必要であった線維芽細胞などフィーダーレイヤーとなる細胞の調製や該細胞の不稔化の工程を省くことができた。また該方法で接着能および増殖能を有した培養器は、長期間細胞の接着性および増殖性を保持したまま、貯蔵が可能である。しかも該方法における場合に比し細胞の接着性および増殖性を向上させることができることを見出し、本発明を完成するにいたった。

【 0 0 1 0 】

すなわち、本発明は、  
 哺乳動物由来の線維芽細胞を播種、培養後、死滅させる工程を含む細胞の接着および増殖方法（請求項 1）、  
 死滅させた線維芽細胞の少なくとも一部を剥離させることを特徴とする請求項 1 記載の細胞の接着および増殖方法（請求項 2）、  
 死滅させた線維芽細胞を完全に剥離させることを特徴とする請求項 1 記載の細胞の接着および増殖方法（請求項 3）、  
 凍結および／または乾燥処理により線維芽細胞を死滅させることを特徴とする請求項 1 記載の細胞の接着および増殖方法（請求項 4）、  
 線維芽細胞が 3 T 3 マウス肺線維芽細胞であることを特徴とする請求項 1 記載の細胞の接着および増殖方法（請求項 5）、  
 細胞が上皮系細胞であることを特徴とする請求項 1 記載の細胞の接着および増殖方法（請求項 6）、  
 上皮系細胞が表皮角質化細胞であることを特徴とする請求項 6 記載の細胞の接着および増殖方法（請求項 7）、  
 細胞が肝細胞であることを特徴とする請求項 1 記載の細胞の接着および増殖方法（請求項 8）、  
 請求項 1 記載の細胞の接着および増殖方法により培養された表皮細胞によって作製された表皮細胞シート（請求項 9）および



請求項 1 記載の細胞の接着および増殖方法により培養された表皮細胞を用いて、調製された表皮細胞懸濁液（請求項 1 0）に関する。

【 0 0 1 1 】

【発明の実施の形態】

本発明は、哺乳動物由来の線維芽細胞を播種、培養後、死滅させる工程を含む細胞の接着および増殖方法に関するものである。さらに詳しくは、熱傷、創傷、褥瘡または皮膚潰瘍などの皮膚欠損創に用いて、欠損組織を早期に再建させるまたは治療するための表皮細胞シートや表皮細胞懸濁液に用いる表皮細胞の培養法、肝機能解析に重要な肝細胞培養法および前記培養法により作製された表皮細胞シートおよび表皮細胞懸濁液に関するものである。

【 0 0 1 2 】

本発明の接着および増殖方法により接着および増殖する細胞には、上皮系細胞や肝細胞などの従来のフィーダーレイヤー法により培養されうる細胞が含まれる。「上皮系細胞」の語は、小腸、口腔、鼻腔などの表面細胞である粘膜上皮細胞や角膜上皮細胞などの上皮細胞および皮膚上皮に存在し分裂後脱核し角質化する細胞である表皮細胞を含むものである。また、肝細胞とは肝小葉を構成する細胞である。

【 0 0 1 3 】

本発明の細胞の接着および増殖方法においては、哺乳動物由来の線維芽細胞を培養後に死滅させて、その少なくとも一部を剥離して除去し、培養器の培養面に細胞の接着および増殖に必要な細胞外マトリックスなどの成分を存在させることが重要となる。

【 0 0 1 4 】

線維芽細胞としては、たとえば、マウス、ヒト、ラット、ハムスター、ウサギなどの哺乳動物由来の線維芽細胞、好ましくは従来のフィーダーレイヤー法で汎用されている 3 T 3 マウス肺線維芽細胞が用いられる。該細胞の播種、培養条件は、とくに限定されるものではなく、一般の方法が用いられる。たとえば、培養器内で単独に増殖した線維芽細胞を、エチレンジアミン四酢酸ナトリウム（E D

TA) を濃度  $0.206 \text{ mg/ml}$  に調製したリン酸緩衝液に  $0.25 \text{ w/v} \%$  となるようにトリプシンを溶解したトリプシン溶液などで剥離し、ウシ胎児血清  $5 \sim 10 \%$  含有の培地に懸濁して培養器に播種し、その後、炭酸ガス培養装置内に静置する。その際用いられる培養器としては、コラーゲンなどの細胞外マトリックスをコーティングした細胞培養器などの特殊な細胞培養器は必要でなく、3T3 線維芽細胞などが接着し増殖し得る培養器であれば、材質や形状は、とくに限定されるものではない。市販の接着細胞培養容器（フラスコ、シャーレ、ローラボトル、ウェルプレート、トレイ）または通常の合成高分子からなる膜、フィルム、プレート、さらには生体高分子からなる膜、フィルム、およびマイクロビーズなどの担体も培養器として選択することができ、従来に比べコストを大幅に低減することができる。

## 【0015】

このようにして培養した線維芽細胞を死滅させ、死滅した細胞（以下、死細胞という）を剥離して除去し、細胞の接着性および増殖性に必要な成分を培養器の培養面に残す。その結果、培養面に細胞の接着性および増殖性が付与されることとなる。該接着性および増殖性付与の観点から、好ましくは  $1.0 \times 10^2 \sim 1.0 \times 10^5$  細胞個/ $\text{cm}^2$ 、より好ましくは、 $1.0 \times 10^3 \sim 1.0 \times 10^5$  細胞個/ $\text{cm}^2$  の線維芽細胞を播種し、前記条件にしたがって培養する。

## 【0016】

つづく線維芽細胞を死滅させる工程では、細胞の接着に必要な成分を変性させない条件で、しかも、実質的に完全に該細胞を死滅させることが必要である。死滅を実質的に完全に行うことにより該細胞の除去を容易に確実に行うことができる。その結果、最終的に得られる表皮細胞シートおよび表皮細胞懸濁液への異種細胞の混入を防ぐことができる。また、完全死滅であって、従来の不稔化ではなく、マイトマイシンCなどの薬剤処理は不要であるので該薬剤などの残留の心配もない。

## 【0017】

死滅させる方法としては、好ましくは凍結、凍結乾燥、乾燥、低温での乾燥、紫外線、ガンマ線・電子線などの電磁波の使用があげられる。これら方法であれ

ば、該細胞を実質的に完全に死滅させることができ、また細胞の接着および増殖に必要な成分は変性されず、接着性および増殖性が維持される。そのような培養器に表皮細胞が播種され培養された場合、良好に表皮細胞が接着および増殖し、実用に適する表皮細胞シートが形成される。さらに、より好ましくは、凍結の使用があげられる。本方法は、操作が容易で、一度に大量に繊維芽細胞を死滅させることができ、しかも装置が他の方法で使用するものよりも安価である。また、細胞が死滅した後もそのまま凍結しつづけることで、細胞の接着性および増殖性を保持したまま長期間保存することが可能である。なお、本凍結操作は、凍結およびそれにつづく解凍、また、凍結・解凍の繰り返し操作を含むものである。

## 【 0 0 1 8 】

乾燥による場合の具体的な条件を示す。乾燥手段としては、一般的な乾燥器を用いればよく、乾燥温度は、好ましくは、凍結しない温度（0℃付近）～60℃、より好ましくは、4～30℃とするのがよい。前記したように、有効成分の変性を抑えることが重要であり、それゆえ、これら穏やかな条件で繊維芽細胞を死滅せしめる。

## 【 0 0 1 9 】

一方、凍結による場合、凍結手段としては、凍結乾燥器、冷凍庫、超低温冷凍庫、液化炭酸ガス、液化チッ素ガスなどが使用される。凍結温度は、凍結が可能な温度であればいずれの温度でもよく、通常は0℃以下である。また、細胞の凍結速度は細胞の死滅に影響するため、好ましくはプログラムフリーザーなどを用い、徐冷による凍結を行うのがよい。

## 【 0 0 2 0 】

前記方法により細胞を死滅させたあと、それら死滅した細胞を剥離して除去する。なお、「剥離」の語は、たとえば、剥がす、洗い流すなどの死細胞を除去し得る方法の全てを含む概念のものである。

## 【 0 0 2 1 】

本発明の方法により細胞の接着性および増殖性が付与された培養器を使用して得られる表皮細胞シートおよび表皮細胞懸濁液中に3T3マウス肺線維芽細胞などを混入させないためには、本工程で完全に細胞を除去することが必要である。

しかしながら、表皮細胞の接着性および増殖性という観点からは完全に細胞を除去することは必ずしも必要ではなく、該接着性および増殖性に影響を与えない程度に、すなわち少なくとも一部が剥離され除去されればよい。なお、死細胞の除去の程度を示す、「少なくとも一部が剥離され」の語は、具体的には、細胞の死滅処理直前の細胞数に対し、好ましくは50%以上、より好ましくは80%以上の死細胞を除去することを意味し、最も好ましくは100%除去することである。

#### 【0022】

死細胞の除去は、一般には、リン酸緩衝液、ハンクス液、生理食塩水など細胞の接着および増殖に必要な有効成分を変性させない、いわゆる等張液により培養面をリンスすることにより行う。

#### 【0023】

死細胞の除去の程度は、位相差顕微鏡観察のような方法により容易に確認することができる。その際、100%の死細胞の除去が確認されれば、得られる表皮細胞シートおよび表皮細胞懸濁液への3T3マウス肺線維芽細胞などの混入は全くないということである。しかしながら、100%の死細胞除去は困難な操作ではなく通常の操作により死細胞はほぼ完全に容易に除去され得、また、死滅後の細胞は細胞培養液中に、完全に剥離するために、本発明の方法により細胞の接着性および増殖性が付与された培養器より得られた表皮細胞シートおよび表皮細胞懸濁液は実質的に異種細胞の混入は全くない。従来、フィーダーレイヤー法によってしか実用的に使用でき得る表皮細胞シートは作製できず、この場合、ヒト以外の細胞をフィーダーレイヤーに用いる場合には、少なからず異種細胞の混入があったことから、本発明の方法により細胞の接着性および増殖性が付与された培養器より得られる表皮細胞シートおよび表皮細胞懸濁液は、異種細胞の混入のない優れた表皮細胞シートおよび表皮細胞懸濁液である。

#### 【0024】

前記各操作により得られる、死細胞を除去し細胞の接着および増殖に必要な成分を残したシャーレなど、細胞の接着性および増殖性が付与された培養器は、たとえば、2～8℃の冷蔵庫、または-30℃、-80℃などのディープフリーザ

ーなどにおいて、少なくとも半年から1年程度はその性能を保持したまま保存することができる。それゆえ、従来のフィーダーレイヤー法で必要であった表皮細胞播種直前のフィーダーレイヤー調製作業、たとえば、3T3細胞を、 $\gamma$ 線、マイトマイシンCなどで分裂能を欠失させたのち培養器に $1 \times 10^4$ 細胞個/ $\text{cm}^2$ 程度になるように播種することなどを省略することができる。また、従来のフィーダーレイヤーは、約2日程度しかその性能を保持できなかったが、本発明の方法により細胞の接着性および増殖性が付与された培養器は、少なくとも半年から1年程度は保存が可能である。また、本発明の方法により細胞の接着性および増殖性が付与された培養器は、その作製操作が簡単で一度に大量に同程度の活性をもつものを作製することができることから、大きくコストを低減することも可能である。さらに、フィーダーレイヤー調製のための線維芽細胞の日常的な継代の必要性もなくなる。

## 【0025】

前記表皮細胞シートは、前記本発明の細胞の接着性および増殖性を付与する方法を用いることにより、容易に簡便に、しかも必要なときに必要な量を作製することが可能である。その具体的な作製方法は、本発明の方法により細胞の接着性および増殖性を付与された培養器を用いる以外は、通常の表皮細胞シートを作製する方法と同様である。たとえば、表皮細胞を $1.0 \times 10^4$ 細胞個/ $\text{cm}^2$ で播種した後、1週間に2回程度の割合で培地を交換しながら、7～21日間程度培養することにより作製することができる。

## 【0026】

前記表皮細胞懸濁液は、本発明の方法により細胞の接着性および増殖性を付与された培養器を用いる以外は、通常の表皮細胞懸濁液を作製する方法と同様である。たとえば、表皮細胞を $1.0 \times 10^4$ 細胞個/ $\text{cm}^2$ で播種した後、1週間に2回程度の割合で培地を交換しながら、3～21日程度培養する。その後トリプシンなどの酵素を用いてほぼ単細胞化し、中性コラーゲン溶液などに懸濁して作製することができる。

## 【0027】

以下、本発明を具体的に実施例で示すが、これら実施例は本発明を限定するも

のではない。

【0028】

【実施例】

実施例 1

培養フラスコ（培養面積  $25\text{ cm}^2$ ）に株化された 3T3 マウス肺線維芽細胞を  $3 \times 10^5$  細胞個 /  $\text{cm}^2$  で播種し、炭酸ガス培養装置（ $37^\circ\text{C}$ 、5%炭酸ガス濃度に設定）内で 4 日間培養した。培地は 10%ウシ胎児血清含有ダルベッコ改変イーグル基本培地（DMEM+10%FBS）を使用した。

【0029】

培養後、培養フラスコの培養上清を吸引除去し、 $-85^\circ\text{C}$  のディープフリーザー中に 12 時間静置、凍結した。ついで、室温で解凍し、5 ml のリン酸緩衝液で培養面をリンスして死細胞を除去した。その後、再度、培養フラスコを  $-85^\circ\text{C}$  のディープフリーザー中に一晩静置し凍結した。

【0030】

培養フラスコを室温で解凍し、そこにヒト皮膚より回収した表皮細胞を  $1 \times 10^4$  細胞個 /  $\text{cm}^2$  となるように播種した（3T3 フローズン）。

【0031】

一方、コントロールとして培養フラスコ（培養面積  $25\text{ cm}^2$ ）に  $1 \times 10^4$  細胞個 /  $\text{cm}^2$  となるようにして、マイトマイシン C 処理を行い、分裂能を欠失させた 3T3 マウス肺線維芽細胞をあらかじめ播種しておいた別の培養フラスコを用意した。

【0032】

これら培養フラスコを炭酸ガス培養装置（ $37^\circ\text{C}$ 、5%炭酸ガス濃度に設定）内で 8 日間培養した。培地は 3%ウシ胎児血清含有グリーン培地（グリーン+3%FBS）を使用した。

【0033】

8 日間培養後、表皮細胞シートが培養器中の培養面に形成された。これをディスペーゼ処理して培養面から剥離し、エチレンジアミン四酢酸ナトリウム（EDTA）を濃度  $0.206\text{ mg/ml}$  に調製したリン酸緩衝液に  $0.25\text{ w/v}\%$

となるようにトリプシンを溶解したトリプシン溶液で表皮細胞を単細胞化し、血球計算盤で細胞数を測定した。

【0034】

なお、デイスパーゼ処理は、10,000PUのデイスパーゼをダルベッコ改変イーグル基本培地10mlに溶解したデイスパーゼ溶液3mlを、培養フラスコに添加し、炭酸ガス培養装置中に1時間程度静置して行なった。

【0035】

コントロールおよび3T3フローズンの表皮細胞数の測定を3回行ない、その3回の測定結果の平均値を比較して図1に示した。本発明の培養器（3T3フローズン）では、従来の3T3マウス肺線維芽細胞をフィーダーレイヤーとして用いるフィーダーレイヤー法（コントロール）に表皮細胞を播種し、同じく8日間培養したものに比し、図1に示すごとく、より多くの表皮細胞が接着および増殖されていた。

【0036】

実施例2

培養フラスコ（培養面積 $25\text{ cm}^2$ ）に株化された3T3マウス肺線維芽細胞を、 $3 \times 10^5$ 細胞個/ $\text{cm}^2$ で播種し、炭酸ガス培養装置（ $37^\circ\text{C}$ 、5%炭酸ガス濃度に設定）内で4日間培養した。培地は10%ウシ胎児血清含有ダルベッコ改変イーグル基本培地（DMEM+10%FBS）を使用した。

【0037】

培養後、培養フラスコの培養上清を吸引除去し $30^\circ\text{C}$ に保持しておいた乾燥器中に48時間静置した。

【0038】

この培養フラスコに、ヒト皮膚より回収してきた表皮細胞を $1 \times 10^4$ 細胞個/ $\text{cm}^2$ となるように播種した。培地は3%ウシ胎児血清含有グリーン培地を用いた。4日後表皮細胞のコロニーを観察すると、3T3マウス肺線維芽細胞の混入がなく、表皮細胞が増殖した様子が観察された。

【0039】

実施例3

培養フラスコ（培養面積  $25\text{ cm}^2$ ）に株化された 3T3 マウス肺線維芽細胞を、 $3 \times 10^5$  細胞個 /  $\text{cm}^2$  で播種し、炭酸ガス培養装置（ $37^\circ\text{C}$ 、5% 炭酸ガス濃度に設定）内で 4 日間培養した。培地は 10% ウシ胎児血清含有ダルベッコ改変イーグル基本培地（DMEM+10% FBS）を使用した。

【0040】

培養後、培養フラスコの培養上清を吸引除去し凍結乾燥機で凍結乾燥を行った。スケジュールは  $-30^\circ\text{C}$  に 1 時間保持、真空吸引による乾燥後、 $1.5^\circ\text{C}/\text{分}$  で温度を上昇させ  $20^\circ\text{C}$  で 20 時間保持した。

【0041】

この培養フラスコに、ヒト皮膚より回収してきた表皮細胞を  $1 \times 10^4$  細胞個 /  $\text{cm}^2$  となるように播種した。培地は 3% ウシ胎児血清含有グリーン培地を用いた。4 日後表皮細胞のコロニーを観察すると、3T3 マウス肺線維芽細胞の混入がなく、表皮細胞が増殖した様子が観察された。

【0042】

#### 実施例 4

培養フラスコ（培養面積  $25\text{ cm}^2$ ）に株化された 3T3 マウス肺線維芽細胞を、 $3 \times 10^5$  細胞個 /  $\text{cm}^2$  で播種し、炭酸ガス培養装置（ $37^\circ\text{C}$ 、5% 炭酸ガス濃度に設定）内で 4 日間培養した。培地は 10% ウシ胎児血清含有ダルベッコ改変イーグル基本培地（DMEM+10% FBS）を使用した。

【0043】

培養後、培養フラスコの培養上清を吸引除去し  $-85^\circ\text{C}$  のディープフリーザー中に 12 時間静置し、凍結した。

【0044】

この培養フラスコを室温で解凍し、5 ml のリン酸緩衝液で培養面をリンスし、細胞の残骸を除去した。

【0045】

この培養フラスコを再び  $-85^\circ\text{C}$  のディープフリーザー中に一晩静置し、凍結した。

【0046】



この培養フラスコを室温で解凍し、そこにヒト皮膚より回収してきた表皮細胞を  $1 \times 10^4$  細胞個 /  $\text{cm}^2$  となるように播種した。

【0047】

この培養フラスコを炭酸ガス培養装置（37℃、5%炭酸ガス濃度に設定）内で8日間培養した。培地は3%ウシ胎児血清含有グリーン培地（グリーン+3%FBS）を使用した。

【0048】

ディスパーゼ処理により表皮細胞を培養面から剥離し、エチレンジアミン四酢酸ナトリウム（EDTA）を濃度0.206mg/mlに調製したリン酸緩衝液に0.25w/v%となるようにトリプシンを溶解したトリプシン溶液で表皮細胞を単細胞化し、血球計算盤で細胞数を測定し、 $3 \times 10^5$  細胞個/mlとなるように中性コラーゲン溶液に懸濁し、表皮細胞懸濁液を調製した。なお、中性コラーゲン溶液はダルベッコ改変イーグル基本培地中に成豚由来のアテロコラーゲンを0.2%になるように溶解し、pHを7.4に調整したものを使用した。

【0049】

【発明の効果】

線維芽細胞を播種、培養後、死滅させ、少なくとも一部を剥離することで、（1）表皮細胞の培養面への接着のフィーダーレイヤーとして使用される生きた3T3マウス肺線維芽細胞などが、表皮細胞へ混入する危険を回避させ得る。また、（2）3T3マウス肺線維芽細胞などをフィーダーレイヤーとする際に、分裂・増殖能を欠失するために投与するマイトマイシンCなどの薬剤残留の危険を回避させ得る。

【0050】

線維芽細胞を播種、培養後、死滅させ、剥離して除去し、該培養細胞が分泌して堆積した細胞外マトリックスなどの成分を実質的に培養器の培養面に残すことで、特殊な細胞培養用容器を使用しなくとも、3T3マウス肺線維芽細胞などが接着し増殖し得る培養器であれば使用することができ、コストを低減することができる。

【0051】

3 T 3 マウス肺線維芽細胞などの細胞死滅処理後、表皮細胞接着性を維持したまま、該培養器を保存することができるので、従来までの表皮細胞播種直前のフィーダーレイヤー調製作業を省略することができる。また、同等な表皮細胞接着性をもった培養器を、一度に大量に作製することができるので、コストを低減することができる。

【0052】

さらに、フィーダーレイヤーとして使用する線維芽細胞の日常的な継代（細胞が培養器内で過密になりすぎないように他の容器に植え継ぐこと）の必要性がなくなる。

【図面の簡単な説明】

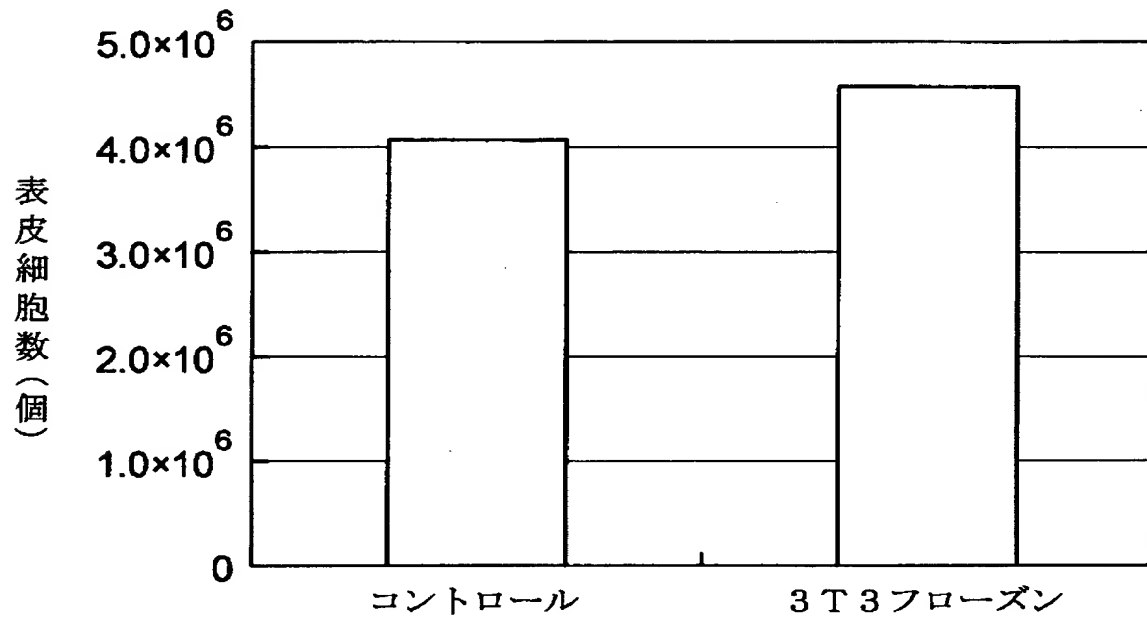
【図 1】

実施例 1 のコントロールおよび 3 T 3 フローズンのそれぞれの培養フラスコ（培養面積  $25 \text{ cm}^2$ ）から回収された表皮細胞数の測定を 3 回行ない、その 3 回の測定結果の平均値を示した棒グラフである。

【書類名】

図面

【図 1】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明は、細胞の接着および増殖方法を提供することを目的とする。

【解決手段】 哺乳動物由来の線維芽細胞を培養器内で培養したあと、該培養器中で凍結および／または乾燥などの処理により該培養細胞を死滅させ、少なくとも一部を剥離することにより、実質的に、該培養細胞が分泌して堆積した細胞外マトリックスなどの成分を培養器中の培養面に残すことにより、細胞の接着性および増殖性を付与、向上させる細胞の接着および増殖方法を用いる。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000138082]

1. 変更年月日	1990年 8月20日
[変更理由]	新規登録
住 所	愛知県名古屋市中区葵3丁目21番19号
氏 名	株式会社メニコン